



(19) Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) Numéro de publication : 0 677 582 A1

BEST AVAILABLE COPY

(12)

## DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt : 95400592.2

(51) Int. Cl.<sup>6</sup> : C12N 15/12, C12Q 1/68,  
C07K 14/74, G01N 33/569,  
C07K 16/28, A61K 38/17

(22) Date de dépôt : 17.03.95

(30) Priorité : 18.03.94 FR 9403179

(43) Date de publication de la demande :  
18.10.95 Bulletin 95/42

(84) Etats contractants désignés :  
CH DE FR GB LI NL

(71) Demandeur : COMMISSARIAT A L'ENERGIE  
ATOMIQUE (CEA)  
Etablissement Public,  
31-33, rue de la Fédération  
F-75015 Paris (FR)

(72) Inventeur : Carosella, Edgardo Delfino  
23, rue George Sand  
F-75016 Paris (FR)  
Inventeur : Moreau, Philippe  
8, rue Bougainville  
F-91170 Viry-Chatillon (FR)  
Inventeur : Gluckman, Eliane  
70, Boulevard Port Royal  
F-75005 Paris (FR)  
Inventeur : Kirszenbaum, Marek  
Résidence de la Colline -C,  
rue François Leroux  
F-91400 Orsay (FR)

(74) Mandataire : Orès, Bernard et al  
Cabinet ORES  
6, Avenue de Messine  
F-75008 Paris (FR)

(54) Transcrits du gène de CMH de classe I HLA-G et leurs applications.

(57) Transcrits du gène du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I HLA-G, présents dans les trophoblastes foetaux et/ou dans les cellules mononucléées circulantes de l'adulte ainsi que leurs applications. Soit lesdits transcrits ne comprennent pas l'exon 4 et comprennent successivement de 5' en 3' : un fragment codant pour le peptide signal (exon 1), un fragment codant pour le domaine  $\alpha 1$  (exon 2), un fragment codant pour le domaine  $\alpha 2$  (exon 3), un fragment codant pour le domaine transmembranaire TM (exon 5), un fragment codant pour le domaine cytoplasmique (exon 6) et le fragment 3' non traduit (exon 8), laquelle séquence est dénommée HLA-G4 ; soit lesdits transcrits comprennent un intron 4.

EP 0 677 582 A1

Jouve, 18, rue Saint-Denis, 75001 PARIS

La présente invention est relative à des transcrits du gène du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I HLA-G, présents dans les trophoblastes foetaux et/ou dans les cellules mononucléées circulantes de l'adulte ainsi qu'à leurs applications.

Les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), se divisent en plusieurs classes, les antigènes de classe I (HLA-A, HLA-B et HLA-C) qui présentent 3 domaines globulaires ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ ), et dont le domaine  $\alpha 3$  est associé à la  $\beta 2$  microglobuline, les antigènes de classe II ((HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR) et les antigènes de classe III (complément).

Les antigènes de classe I comprennent, outre les antigènes précités, d'autres antigènes, dits antigènes de classe I non classiques, et notamment les antigènes HLA-E, HLA-F et HLA-G ; ce dernier, en particulier, est exprimé par les trophoblastes extravilleux du placenta humain normal.

La séquence du gène HLA-G (gène HLA-6.0) a été décrite par GERAGHTY et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 9145-9149) : il comprend 4396 paires de bases et présente une organisation intron/exon homologue à celle des gènes HLA-A, -B et -C. De manière plus précise, ce gène comprend 8 exons et une extrémité non traduite 3'UT, correspondant respectivement : exon 1 : séquence signal, exon 2 : domaine  $\alpha 1$ , exon 3 : domaine  $\alpha 2$ , exon 4 : domaine  $\alpha 3$ , exon 5 : région transmembranaire, exon 6 : domaine cytoplasmique I, exon 7 : domaine cytoplasmique II, exon 8 : domaine cytoplasmique III et région 3' non traduite (GERAGHTY et al., précité, ELLIS et al., J. Immunol., 1990, 144, 731-735). Toutefois le gène HLA-G diffère des autres gènes de classe I, en ce que le codon de terminaison de traduction, en phase, est localisé au niveau du deuxième codon de l'exon 6 ; en conséquence, la région cytoplasmique de la protéine codée par ce gène HLA-6.0 est considérablement plus courte que celle des régions cytoplasmiques des protéines HLA-A, -B et -C.

Contrairement aux autres antigènes de classe I, cet antigène HLA-G (clones G 6.0 et BeWO.G7) ne serait pas polymorphique et ne serait pas exprimé dans d'autres types cellulaires que les trophoblastes (ELLIS et al., J. Immunol., 1990, précité).

D'autres clones HLA-G ont été isolés (TAMAKI et al., Microbiol. Immunol., 1993, 37, 8, 633-640) ; en particulier, le clone HLA-G, dénommé 7.0E, a été isolé d'un placenta japonais et sa séquence en aminoacide s'est révélée identique à celle des clones précités G6.0 et BeWO.G7. Les Auteurs de cet article montrent, en outre, qu'il peut exister une certaine hétérogénéité dans les gènes HLA-G.

Ces antigènes HLA-G sont essentiellement exprimés par les cellules cytotrophoblastiques du placenta ; toutefois, l'ARNm HLA-G a été retrouvé dans les tissus de l'oeil et dans le foie foetal (ISHITANI et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 3947-3951 ; dont la numérotation correspond à celle de la séquence HLA 6.0 telle que décrite dans SHUKLA et al., Nucleic Acids Research, 1990, 18, 8, 2189).

Les antigènes HLA-G exprimés par les cytotrophoblastes sont considérés comme jouant un rôle dans la protection du placenta (absence de rejet). En outre, dans la mesure où l'antigène HLA-G est monomorphe, il peut également être impliqué dans la croissance ou la fonction des cellules placentaires (KOVATS et al., Science, 1990, 248, 220-223).

D'autres recherches concernant cet antigène non classique de classe I (ISHITANI et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 3947-3951) ont montré que le transcrit primaire du gène HLA-G peut être épissé de plusieurs manières et produit au moins 3 ARNm matures distincts : le transcrit primaire d'HLA-G fournit une copie complète (G1) de 1 200 bp, un fragment de 900 bp (G2) et un fragment de 600 bp (G3).

Le transcrit G1 ne comprend pas l'exon 7 et correspond à la séquence décrite par ELLIS et al. (précité), c'est-à-dire qu'il code pour une protéine qui comprend une séquence leader, trois domaines externes, une région transmembranaire et une séquence cytoplasmique. L'ARNm G2 ne comprend pas l'exon 3, c'est-à-dire qu'il code pour une protéine dans laquelle les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 3$  sont directement joints ; l'ARNm G3 ne contient ni l'exon 3, ni l'exon 4, c'est-à-dire qu'il code pour une protéine dans laquelle le domaine  $\alpha 1$  et la séquence transmembranaire sont directement joints.

L'épissage qui prévaut pour l'obtention de l'antigène HLA-G2 entraîne la jonction d'une adénine (A) (provenant du domaine codant pour  $\alpha 1$ ) avec une séquence AC (issue du domaine codant pour  $\alpha 3$ ), ce qui entraîne la création d'un codon AAC (asparagine) à la place du codon GAC (acide aspartique), rencontré au début de la séquence codant pour le domaine  $\alpha 3$  dans HLA-G1.

L'épissage généré pour l'obtention de HLA-G3 n'entraîne pas la formation d'un nouveau codon dans la zone d'épissage.

Les Auteurs de cet article ont également analysé les différentes protéines exprimées : les 3 ARNm sont traduits en protéine dans la lignée cellulaire .221-G.

Les Auteurs de cet article concluent à un rôle fondamental de l'HLA-G dans la protection du placenta vis-à-vis d'une réponse immunitaire maternelle (induction d'une tolérance immunitaire). Toutefois, il est précisé que le rôle de la protéine G3, qui ne contient pas le domaine  $\alpha 3$  n'est pas établi.

La complexité du CMH et le rôle de l'antigène HLA-G dans les mécanismes de tolérance ont conduit les Inventeurs à rechercher au moins un transcrit HLA-G, qui pourrait à la fois :

- aisément être mis en évidence dans le sang périphérique,
- serait apte à exprimer, dans des conditions appropriées, une protéine convenable, de préférence soluble, en tant qu'agent de tolérance,
- permettrait de sélectionner des cellules souches immatures aptes à être utilisées dans des greffes de moelle osseuse,
- et permettrait également de mettre en évidence dans le sang maternel, des cellules foetales dans lesquelles ce gène s'exprime.

En conséquence, la présente invention s'est donné pour but de pourvoir à des séquences issues d'un ARNm du gène HLA-G, aptes à résoudre l'ensemble des problèmes exposés ci-dessus.

De telles séquences trouvent application notamment :

- dans la séparation, dans un échantillon de sang maternel, des cellules foetales,
- dans un procédé d'enrichissement en cellules souches immatures, aptes à être utilisées dans les greffes de la moelle et
- dans la séparation spécifique des cellules mononucléées circulantes
- et dans la préparation d'un médicament immunomodulateur.

La présente invention a pour objet une séquence d'ADNc, issue d'un ARNm du gène HLA-G humain du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), caractérisée en ce qu'elle comprend successivement de 5' en 3' :

- un fragment codant pour le peptide signal (exon 1),
- un fragment codant pour le domaine  $\alpha 1$  (exon 2),
- un fragment codant pour le domaine  $\alpha 2$  (exon 3),
- un fragment codant pour le domaine transmembranaire TM (exon 5),
- un fragment codant pour le domaine cytoplasmique (exon 6) et
- le fragment 3' non traduit (exon 8), laquelle séquence est dénommée HLA-G 3-5 ou selon les conventions actuellement en vigueur HLA-G4.

Une telle séquence a la particularité de ne pas inclure l'exon 4 et de présenter l'ensemble des propriétés énumérées ci-dessus, et d'être notamment détectable dans les cellules mononucléées circulantes de l'adulte.

On entend par séquences mononucléées, toutes les cellules mononucléées du sang périphérique, à l'exception des cellules tueuses (cellules NK et autres LGL (*large granular lymphocytes*)).

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, ladite séquence comprend successivement de 5' en 3' :

- le fragment codant pour le domaine  $\alpha 2$  (exon 3),
- le fragment codant pour le domaine transmembranaire TM (exon 5),
- le fragment codant pour le domaine cytoplasmique (exon 6) et
- le fragment 3' non traduit (exon 8).

Conformément à l'invention, une telle séquence qui code pour une protéine dans laquelle le domaine  $\alpha 2$  et la séquence transmembranaire HLA-G sont directement joints, présente la SEQ ID NO: 1 suivante :

CC AAT GTG GCT GAA CAA AGG AGA GCC TAC CTG GAG GGC ACG TGC  
 40 GTG GAG TGG CTC CAC AGA TAC CTG GAG AAC GGG AAG GAG ATG CTG  
 CAG CGC GCG G<sub>3</sub>/5AG CAG TCT TCC CTG CCC ACC ATC CCC ATC ATG  
 GGT ATC GTT GCT GGC CTG GTT GTC CTT GCA GCT GTA GTC ACT GGA  
 45 GCT GCG GTC GCT GTG CTG TGG AGX<sub>1</sub> AAG AAG AGC TCA G<sub>5</sub>/6AT  
 TGA AAA GGA GGG AGC TAC TCT CAG GCT GCA A<sub>6</sub>/8TG TGA<sub>8</sub>/  
 AACAGCTGCCCTGTGTGGACTGAGTGGCAAGTCCCTTGTGACTTCAAGA  
 50 ACCCTGACTTCTCTTX<sub>2</sub>TGCAGAGACCAGCCCACCCCTGTGCCACCATGA  
 CCCTCTTX<sub>3</sub>CTCATGCTGAAGTGCATTCTCCCCAATCACCTTCCTGTTCC  
 AGAAAAGGGCTGGATGTCTCCGTCTGTCTCA

55 dans laquelle

- X<sub>1</sub> représente G ou A,
- X<sub>2</sub> représente C ou G,
- X<sub>3</sub> représente T ou C.

et comprend 0,43 kb.

De manière inattendue, un tel transcrit est détecté aussi bien dans les trophoblastes (premier trimestre de gestation) que dans les cellules mononucléées circulantes chez l'adulte.

La présente invention a également pour objet un produit de transcription du gène HLA-G humain du CMH, caractérisé en ce qu'il inclut, à partir de l'extrémité 5' :

- un fragment codant pour le peptide signal (exon 1),
- un fragment codant pour le domaine  $\alpha 1$  (exon 2),
- un fragment codant pour le domaine  $\alpha 2$  (exon 3),
- un fragment codant pour le domaine transmembranaire TM (exon 5), et
- un fragment codant pour le domaine cytoplasmique (exon 6) de HLA-G et en ce qu'il comprend 0,43 kb.

La présente invention a également pour objet des fragments oligonucléotidiques de la séquence, ne comprenant pas l'exon 4, conforme à l'invention ; parmi ces fragments, dont la numérotation correspond à celle de la séquence HLA 6.0, telle que décrite dans SHUKLA et al. précité, on peut citer :

15 - GGA AGA GGA GAC ACCG GAA CA (SEQ ID NO: 2),

dénommé G.257 (+), situé au niveau de l'exon 2 et correspondant au fragment 257-276 de ladite séquence d'ADNc ;

20 - CCA ATG TGG CTG AAC AAA GG (SEQ ID NO: 3),

dénommé G.526 (+), situé au niveau de l'exon 3 et correspondant au fragment 526-545 de ladite séquence d'ADNc ;

25 - CCC CTT TTC TGG AAC AGG AA (SEQ ID NO: 4),

dénommé G. 1200 (-) et correspondant au fragment 1200-1219 de ladite séquence d'ADNc ;

- TGA GAC AGA GAC GGA GAC AT (SEQ ID NO: 5),

30 dénommé G.1225 (-) et correspondant au fragment 1225-1244 de ladite séquence d'ADNc ;

- CAG CGC GCG GAG CAG TCT TC (SEQ ID NO: 6),

35 dénommé G.3.5 (+) et correspondant à la jonction exon 3-exon 5 de ladite séquence d'ADNc.

La présente invention a également pour objet des sondes nucléotidiques, caractérisées en ce qu'elles sont constituées par une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus ou un fragment de celle-ci, marquée à l'aide d'un marqueur tel qu'un isotope radioactif, une enzyme appropriée ou un fluorochrome.

40 Selon un mode de réalisation avantageux de ladite sonde, elle présente la séquence ID NO: 6 ci-dessus, spécifique du transcrit, sans exon 4, conforme à l'invention.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite sonde, elle présente la séquence ID NO: 4 ci-dessus ; une telle sonde est apte à détecter tous les produits de transcription du gène HLA-G humain du CMH.

La présente invention a également pour objet des amorces, aptes à être utilisées pour amplifier une séquence nucléotidique conforme à l'invention, telle que définie ci-dessus (séquence sans exon 4).

45 Selon un mode de réalisation avantageux desdites amorces, une paire d'amorces préférée comprend :

(1) GGA AGA GGA GAC ACCG GAA (SEQ ID NO: 2)

(2) TGA GAC AGA GAC GGA GAC AT (SEQ ID NO: 5).

50

Selon un autre mode de réalisation avantageux desdites amorces, une autre paire d'amorces préférée comprend :

55 (3) CCA ATG TGG CTG AAC AAA GG (SEQ ID NO: 3)

(4) TGA GAC AGA GAC GGA GAC AT (SEQ ID NO: 5).

Egalement de manière inattendue, les Inventeurs ont trouvé que d'autres transcrits peuvent être détectés

dans les cellules mononucléées circulantes l'adulte.

Parmi ces transcrits, on peut citer :

a) le transcrit dénommé HLA-G5, comprenant successivement de 5' en 3' :

- un fragment codant pour le peptide signal (exon 1),
- un fragment codant pour le domaine  $\alpha 1$  (exon 2),
- un fragment codant pour le domaine  $\alpha 2$  (exon 3),
- un fragment codant pour le domaine  $\alpha 3$  (exon 4),
- l'intron 4,
- un fragment codant pour le domaine transmembranaire TM (exon 5),
- un fragment codant pour le domaine cytoplasmique (exon 6) et
- le fragment 3' non traduit (exon 8).

La présence de l'intron 4, entre les exons 4 et 5, provoque une modification du cadre de lecture, lors de la traduction de ce transcrit et en particulier l'apparition d'un codon stop, après l'acide aminé 21 de l'intron 4 ; de ce fait, la protéine codée par ce transcrit, ne présente pas de domaine transmembranaire codé par l'exon 5, ni de domaine cytoplasmique, codé par l'exon 6 et fournit donc une protéine soluble, facile à obtenir à partir des cellules mononucléées circulantes et ayant des propriétés d'immunomodulation intéressantes,

Ce transcrit vient également d'être détecté dans les trophoblastes (J. Immunol. p. 5516-5524, 1994) ; cependant, l'expression de ce transcrit par les cellules mononucléées fournit, de manière inattendue, un outil d'étude, d'analyse et d'action sur l'immunomodulation.

b) le transcrit, dénommé HLA-G6, possédant l'intron 4, mais ayant perdu l'exon 3.

c) des transcrits, tels que définis ci-dessus, en a) ou en b), sans exon 6 et/ou sans exon 8.

En conséquence, la présente invention a également pour objet un procédé d'obtention de protéines solubles immunomodulatrices, caractérisé, en ce qu'il comprend la construction d'un vecteur d'expression dans lequel est insérée une séquence avec intron 4, issue de cellules mononucléées circulantes d'adultes, telle que définie ci-dessus et l'expression desdites protéines solubles.

Les vecteurs d'expression de la famille pBJ peuvent être utilisés. [B. DEVAUX et al., *Generation of monoclonal antibodies against soluble human T cell receptor polypeptides*, Eur. J. Immunol., 1991, 21, 2111-2119 ; V. LITWIN et al., *Receptor Properties of two Varicella-Zoster Virus glycoproteins, gpl and gplIV, Homologous to Herpes Simplex Virus gE and gI*, J. Virol., 1992, 66, 3643-3651 ; A.Y. LIN, *Expression of T Cell Antigen receptor Heterodimers in a Lipid-Linked form*, Science, 1990, 249, 677-679].

La présente invention a également pour objet des peptides ou fragments peptidiques, caractérisés en ce qu'ils sont codés par au moins un fragment tel que défini ci-dessus ou une portion de fragment ou une combinaison de plusieurs fragments tels que définis ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, ledit peptide est codé par un fragment du transcrit HLA-G4 et répond à la SEQ ID NO: 7 ci-après :

Asn-Val-Ala-Glu-Gln-Arg-Arg-Ala-Tyr-Leu-Glu-Gly-Thr-Cys-Val-Glu-Trp-Leu-His-  
Arg-Tyr-Leu-Glu-Asn-Gly-Lys-Glu-Met-Leu-Gln-Arg-Ala-Glu-Gln-Ser-Ser-Leu-Pro-  
Thr-Ile-Pro-Ile-Met-Gly-Ile-Val-Ala-Gly-Leu-Val-Val-Leu-Ala-Ala-Val-Val-Thr-Glu-  
Ala-Ala-Val-Ala-Ala-Val-Leu-Trp-Arg-Lys-Ser-Ser-Asp.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, ledit peptide est codé par un fragment du transcrit HLA-G5 et répond à la SEQ ID NO: 8 :

Asn Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu His Arg  
 Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Met Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr  
 His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro  
 Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Val Glu Leu  
 Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Pro  
 Ser Gly Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu  
 10 Met Leu Arg Trp Ser Lys Glu Gly Asp Gly Ile Met Ser Val Arg Glu Ser Arg Ser  
 Leu Ser/Glu Asp Leu.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, ledit peptide est codé par un fragment du transcript  
 15 HLA-G6 et répond à la SEQ ID NO: 9 :

Gin Ser Glu Ala Asn Pro Pro Lys Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu  
 Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gin  
 20  
 Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp  
 Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Gln Arg Tyr Thr  
 25 Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu Arg Trp Ser Lys Glu gly  
 Asp Gly Gly Ile Met Ser Val Arg Glu Ser Arg Ser Leu Ser Glu Asp Leu.

Selon un autre mode de réalisation avantageux des peptides conformes à l'invention, ils peuvent être obtenus par synthèse.  
 30

Conformément à l'invention, de tels peptides trouvent application en tant que médicaments, notamment dans des compositions immunomodulatrices.

La présente invention a également pour objet un procédé de sélection et d'enrichissement en cellules hématopoïétiques indifférenciées (cellules sanguines immatures ou cellules souches), caractérisé en ce qu'il comprend :

- (a) le prélèvement d'un échantillon sélectionné, selon le cas, parmi le sang périphérique, le sang de cordon ombilical ou la moelle osseuse,
- (b) le mise en contact dudit échantillon avec des anticorps anti-CD34, (DYNABEADS ; DYNAL/BIOSYS, Compiègne, France)
- (c) la séparation des complexes cellules contenant un antigène CD34-anticorps anti-CD34 formés,
- (d) la réalisation d'une RT-PCR *in situ* sur les cellules obtenues à l'étape (c) en présence d'une paire d'amorces marquées à l'aide d'un fluorochrome, conforme à l'invention,
- (e) la séparation des cellules fluorescentes, et
- (f) la sélection des cellules non fluorescentes immatures pluripotentes.

Les cellules obtenues en (f) sont des cellules CD34<sup>+</sup> HLA-G<sup>-</sup>, qui sont les cellules les plus immatures. Un tel procédé permet avantageusement d'obtenir un grand nombre de cellules souches immatures aptes à être utilisées pour des greffes de cellules souches.

Selon un mode de mise oeuvre avantageux dudit procédé, la paire d'amorces est sélectionnée parmi les paires (1)-(2) et (3)-(4) telles que définies ci-dessus.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection de cellules exprimant le transcript HLA-G4, conforme à l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend, *in situ*, la mise en oeuvre d'une RT-PCR, par :

- (a) mise en contact de cellules sanguines avec une paire d'amorces marquées, conforme à l'invention, sélectionnée parmi les paires (1)-(2) et (3)-(4) telles que définies ci-dessus.

(b) séparation des cellules marquées par tout moyen convenable, notamment par cytofluorométrie.

La RT-PCR est notamment décrite dans American J. Pathol., 1993, 143, 6, 1527-1534.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection de cellules sanguines et plus particulièrement de cellules mononucléées circulantes d'adultes, exprimant un transcript comprenant l'intron 4, ca-

ractérisé en ce qu'il comprend, *in situ*, la mise en oeuvre d'une RT-PCR, par :

- (a) mise en contact de cellules sanguines avec une paire d'amorces marquées, conforme à l'invention, sélectionnée parmi les paires (1)-(2) et (3)-(4) telles que définies ci-dessus.
- (b) sélection des transcrits comprenant l'intron 4, par hybridation avec une sonde, éventuellement marquée, sélectionnée parmi la sonde de SEQ ID NO: 10 5'-GAGGCATCATGTCTGTTAGG (dénommée G.I4A) et la sonde de SEQ ID NO: 11 5'-AAAGGAGGTGAAGGTGAGGG (dénommée G.I4B) et
- (b) séparation des cellules marquées par tout moyen convenable, notamment par cytofluorométrie.

La présente invention a également pour objet des anticorps dirigés contre les protéines HLA-G telles que définies ci-dessus.

10 De manière préférée, de tels anticorps sont obtenus par immunisation d'un animal approprié, avec des peptides selon l'invention.

La présente invention a également pour objet un procédé de séparation de cellules foetales nucléées, à partir d'un échantillon de sang maternel, caractérisé en ce qu'il comprend :

- (1) la mise en contact de l'échantillon de sang maternel avec des anticorps dirigés contre les protéines HLA-G telles que définies ci-dessus, et
- (2) la séparation des complexes cellules foetales-anticorps obtenus.

Un tel procédé permet le dépistage prénatal d'anomalies foetales et notamment d'aberrations chromosomiques ou d'aberrations géniques et un dépistage prénatal du sexe, à partir des cellules foetales circulantes ainsi isolées, de manière fiable, de la circulation sanguine maternelle, dans la mesure où seules ces cellules foetales sont porteuses desdites protéines HLA-G.

La présente invention a également pour objet un procédé de séparation spécifique de cellules mononucléées circulantes, caractérisé en ce qu'il comprend, la mise en oeuvre d'une RT-PCR *in situ*, par :

- (a) mise en contact de cellules sanguines avec une paire d'amorces marquées conforme à l'invention et
- (b) séparation des cellules marquées (cytofluorométrie...).

25 Un tel procédé permet, si nécessaire, de séparer en outre les cellules mononucléées n'exprimant pas le gène HLA-G (cellules tueuses, notamment) des autres cellules mononucléées.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

30 Les protéines, exprimées par les transcrits tels que définis ci-dessus, ont également pour fonction de servir à la reconnaissance des récepteurs CD8 sur les cellules T cytotoxiques et jouent donc un rôle dans la surveillance immune. Au niveau de l'interface materno-foetal, cette forme sécrétée pourrait bloquer la reconnaissance de structures cibles n'appartenant pas au complexe majeur d'histocompatibilité et supprimer ainsi la cytotoxicité humaine (tolérance, comme précisé ci-dessus).

35 La présente invention a donc en outre pour objet un procédé de détection de récepteurs CD8, caractérisé en ce que l'on met en contact des cellules mononucléées avec un peptide tel que défini ci-dessus et en ce que l'on détecte les complexes CD8-peptides, par tout moyen approprié (notamment formation d'un complexe antigène-anticorps).

En outre, seules les cellules NK (ou cellules tueuses) n'expriment pas l'ARNm d'HLA-G ; ceci montre que les produits d'expression du gène HLA-G protègent contre l'activité lytique des cellules NK.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

#### EXAMPLE 1 : Transcrit du gène HLA-G épissé, sans exon 4.

##### a) Obtention des cellules adultes et des tissus foetaux :

- Les trophoblastes du premier trimestre de gestation sont obtenus lors d'IVG (6-10 semaines de gestation).
- Les foies foetaux du deuxième trimestre sont obtenus, lors d'interruptions thérapeutiques de grossesse (16 semaines de gestation).

Les tissus sont lavés dans un tampon PBS et les trophoblastes ou le foie sont identifiés au microscope et congelés dans de l'azote liquide.

- Des échantillons de sang périphérique humain sont obtenus chez des volontaires (homme normal).

55 Les cellules mononucléées sont séparées des polynucléaires par centrifugation de densité (Ficoll-Hypaque®) et l'ARNm est isolé des deux populations.

On obtient également des cellules mononucléées enrichies en lymphocytes B par immunoabsorption sur billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti-CD19 (Dynabeads-Dynal/Biosys, France) et des cellules mo-

nonnucléées enrichies en lymphocytes T, par séparation sur Leuko-Pac® (Fenwal Laboratories, USA).

L'enrichissement est d'environ 90 % pour les cellules B et d'environ 87 % pour les cellules T, après estimation par analyse FACS : évaluation des complexes formés respectivement avec des anticorps anti-CD20 ou des anticorps anti-CD3, marqués au FITC et 1.10<sup>5</sup> cellules de chaque sous-population.

5

b) Isolement de l'ARN et amplification par RT-PCR :

L'ARNm total est isolé à partir d'1 g de tissu congelé ou de 2.10<sup>7</sup> cellules, en utilisant le réactif RNA-Zol B® (Bioprobe Systems, France), conformément aux recommandations du fabricant ; la qualité du produit obtenu est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose dénaturant à 1,5 %.

10 L'ADNc est préparé à partir de 10 µg d'ARN total, en présence d'amorce oligo-dT et de transcriptase réverse M-MLV (Gibco-BRL, Life Technologies), par incubation de 20 µl du mélange à 42°C pendant 1 heure, puis à 95°C pendant 5 minutes.

15 Les fragments PCR qui peuvent être obtenus selon les amores utilisées (voir Tableau I ci-après), sont représentés à la figure 1.

Pour amplifier le transcrit G.3-5 (maintenant dénommé HLA-G4) conforme à l'invention (fragment de 0,43 kb), on utilise de préférence les amores G.526 et G.1225 (représentées par des flèches horizontales) ; la sonde utilisée pour détecter ce transcrit amplifié est la sonde G.3-5 (représentée par une ligne épaisse).

20 Les flèches verticales indiquent les sites de restriction spécifiques des exons 3, 4 et 5, utiles pour l'analyse de restriction des produits de la RT-PCR, clonés dans le vecteur pPCRII (B : BglI ; St : StuI ; Ss : SstI).

TABLEAU I

25

	Amorce	Séquence 5' → 3'	Localisation ADNc	ADN génomique
30	G.257 (+) (SEQ ID NO: 2)	GGA AGA GGA GAC ACCG GAA CA	257-276	Ex 2
35	G.526 (+) (SEQ ID NO: 3)	CCA ATG TGG CTG AAC AAA GG	526-545	Ex 3
40	G.1200 (-) (SEQ ID NO: 4)	CCC CTT TTC TGG AAC AGG AA	1200-1219	3'-UT
45	G.1225 (-) (SEQ ID NO: 5)	TGA GAC AGA GAC GGA GAC AT	1225-1244	3'-UT
	G.3-5 (+) (SEQ ID NO: 6)	CAG CGC GCG GAG CAG TCT TC	615-624/ 901-910	Ex 3 / Ex 5
	Classe I (+)	TCC CAC TCC ATG AGG TAT TTC	81-100	Ex 2
	Classe I (-)	TCC AGA AGG CAC CAC CAC AG	814-833	Ex 4

dans lequel Ex. est l'abréviation de exon.

50

Afin de réduire la quantité de produit amplifié non spécifique, l'amplification est réalisée en utilisant la technique *hot-start* : dans un tube de réaction, 200 µM de chaque dNTP, 0,1 µg de chaque amorce et une pastille d'AmpliWax® (Cetus-Perkin Elmer, France), dans 50 µl d'un tampon PCR 1X, sont incubés à 75°C pendant 5 min ; dans un second tube, 2 µl de la solution de RT ou 1 µg d'ADN génomique et 3,5 U de Taq polymérase (Cetus-Perkin Elmer) dans 50 µl de tampon PCR 1X sont incubés à 95°C pendant 5 min.

55

Le contenu des 2 tubes est ensuite mélangé et soumis à 35 cycles de PCR dans les conditions suivantes :

94°C pendant 1 minute,  
61°C pendant 1 minute,  
72°C pendant 1 minute 30.

La dernière étape d'elongation à 72°C est de 10 min.

Les produits PCR sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % et colorés au bromure d'éthidium.

La spécificité des produits obtenus est confirmée par blotting alcalin des fragments (NaOH 0,4 N) sur une membrane de nylon (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham, France), puis une hybridation est ensuite réalisée dans un tampon : 5X SSPE, 5X Denhardt, SDS 0,5 %, ADN de sperme de saumon 100 µg/ml, pendant 2 h à 55°C, en présence d'une sonde oligonucléotidique G-1200 marquée au <sup>32</sup>P ([ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP) et d'un kit de marquage de l'extrémité 5' (Boehringer-Mannheim, France).

Différents contrôles d'amplification sont réalisés : mélange réactionnel RT sans transcriptase réverse M-MLV (RT<sup>-</sup>) et mélange PCR sans matrice d'ADNc (blanc).

Par ailleurs, des contrôles positifs sont réalisés avec des amores ubiquitaires de la classe I des HLA (voir Tableau I).

c) Résultats :

15

1. Avec les amores G.526 et G.1225, deux fragments (0,71 kb et 0,43 kb) sont observés après électrophorèse sur gel et coloration au bromure d'éthidium qui s'hybride avec la sonde G1200 (voir figure 1 et figures 2A et B).

20

2. La RT-PCR de l'ARNm du foie fétal du 2ème trimestre ne montre aucune bande sur le gel, ni aucun signal d'hybridation, alors que l'amplification avec des amores des HLA de classe I entraîne un signal positif (figure 2C).

L'amplification de l'ADN génomique présente une bande à environ 2,2 kb conformément à la séquence génomique d'HLA-G.

3. Le fragment de 0,71 kb correspond au transcrit HLA-G complet tandis que

4. le fragment de 0,43 kb correspond à un transcrit ne contenant pas l'exon 4 ( $\rightarrow$  276 bp) (HLA-G4).

Pour confirmer l'absence de l'exon 4, la bande de 0,43 kb est découpée et séquencée selon la méthode suivante :

Pour générer des matrices de séquençage, les fragments PCR sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 4 %, coupés et élués avec un tampon acétate d'ammonium 0,5 M et EDTA 5 mM et réamplifiés par PCR asymétrique, de manière à générer des produits simple-brin.

Le produit réamplifié est purifié par extraction au phénol-chloroforme, précipité 2 fois avec de l'éthanol, puis séquencé en utilisant le kit de séquençage T7 Sequenase 2.0 (USB/Touzard-Matignon, France).

De plus, les produits de la PCR sont clonés dans le vecteur pPCRII, en utilisant le kit TA Cloning System (Invitrogen, USA), puis séquencés.

Comme le montre la figure 3, le fragment de 0,43 kb présente clairement une jonction entre l'exon 3 et l'exon 5, qui résulte de la perte de l'exon 4.

De plus, le séquençage montre que le transcrit conforme à l'invention ne comprend pas l'exon 7 ; la présence d'un codon stop dans l'exon 6 est en outre observée.

5. Evaluation de la fréquence du transcrit HLA-G4 :

comme suggéré par la figure 2, l'intensité d'hybridation de la bande de 0,43 kb, correspondant au transcrit épissé, est plus faible que celle correspondant à la copie complète ; ceci suggère que ce transcrit est moins abondant dans la population ARNm d'HLA-G.

De manière à évaluer les quantités relatives de ces 2 transcrits, les produits de l'amplification PCR de l'ARNm des trophoblastes du 1er trimestre avec les amores G.526-G.1225 sont clonés dans le vecteur pPCRII, comme précisé ci-dessus.

Sur 260 clones analysés par hybridation des réplicats, soit avec la sonde G1200, soit avec la sonde G.3-5, environ 210 clones présentent une hybridation positive avec la sonde G.1200 et seulement un clone est positif avec la sonde G.3-5.

Ce clone unique a été séquencé, tandis que 5 clones positifs avec la sonde G.1200, choisis au hasard, sont analysés par leur carte de restriction vis-à-vis d'enzymes spécifiques des exons 3 et 4 (voir figure 1).

Une comparaison des séquences montre que le clone positif avec la sonde G.3-5 ne comprend pas l'exon 4, tandis que les 5 autres clones correspondent au transcrit complet.

Ainsi, la fréquence du transcrit conforme à l'invention par rapport au transcrit comprenant la séquence complète peut être estimée à environ 1/200.

La sélection de l'amorce G.526 (spécifique de l'exon 3) a permis d'obtenir, lors de l'amplification PCR, la sélection d'un transcrit dépourvu d'exon 4.

L'absence d'exon 4 crée, à la jonction d'épissage un codon GAG (Glu) à la place du codon GAC (Asp) que l'on retrouve dans le transcrit complet.

L'absence d'exon 4 exclut le domaine  $\alpha$ 3 de la protéine déduite correspondante et confère une nouvelle structure à l'antigène HLA-G, qui peut être exprimé à la surface des cellules trophoblastiques.

Dans cette structure, le domaine  $\alpha$ 2 et la région transmembranaire sont reliés et peuvent induire des modifications conformationnelles de la protéine de surface.

5 En particulier, ladite protéine peut présenter une capacité différente de se lier aux peptides.

**EXEMPLE 2 : Expression du transcript HLA-G complet ou du transcript sans exon 4 dans les cellules mononucléées circulantes périphériques de l'adulte.**

10 La figure 4 montre les résultats de l'amplification PCR obtenue avec les amores G.257-G.1225, à partir de matrices d'ADNc de cellules mononucléaires périphériques obtenues chez l'homme (sujets mâles).

Une bande de 1 kb est observée en gel d'agarose (Figure 4A) ; une hybridation avec la sonde G.1200 révèle une bande de même dimension (figure 4B).

Conformément à la séquence d'ADNc, cette bande correspond au transcript HLA-G complet.

15 Pour confirmer la production de ce transcript, le produit de la PCR est cloné dans un vecteur pPCR II puis séquencé, selon la méthode exposée ci-dessus.

Le fragment de 1 kb est entièrement homologue avec la séquence HLA-G décrite par SHUKLA et al. (Nucleic Acids Research, 1990, 18, 8, 2189).

20 L'amplification PCR de l'ADNc à partir d'une population de polynucléaires avec des amores spécifiques HLA-G génère une bande de faible intensité de même dimension, 0,71 kb, que celle observée avec les cellules mononucléées (contamination de la fraction polynucléaire par des cellules mononucléées).

Pour préciser la spécificité cellulaire de l'expression du gène HLA-G chez les lymphocytes circulants de l'adulte, les populations mononucléaires ont été séparées et une PCR a été réalisée avec des amores spécifiques HLA-G sur l'ADNc obtenu à partir de sous-populations enrichies en cellules T ou en cellules B.

25 Une bande de 1 kb est observée pour les fractions cellules T aussi bien en gel d'agarose qu'en analyse par blot après hybridation avec la sonde G.1200 (figures 4A et B) (transcript complet).

L'utilisation d'une technique PCR *hot-start* a permis de mettre en évidence la présence d'ARNm de HLA-G dans les lymphocytes périphériques de l'adulte, ce transcript étant présent à la fois dans les cellules B et les cellules T.

30 Tous les transcripts alternatifs sont observés pour les cellules mononucléées du sang périphérique.

**EXEMPLE 3 : Transcript du gène HLA-G comprenant l'intron 4.**

a) Obtention des cellules adultes et des tissus foetaux :

35 On procède comme à l'exemple 1.

b) Isolement, extraction et amplification par PCR de l'ARN :

40 L'ARN total est isolé à partir d'1 g de trophoblaste ou de  $2.10^7$  cellules mononucléées, en utilisant le réactif RNA-Zol B® (Bioprobe système, France), conformément aux recommandations du fabricant.

Pour l'extraction de l'ARN cytoplasmique, les cellules sont lysées 5 min dans un tampon glacé contenant Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, nonidet P40 0,5 % et complexe ribonucléoside vanidyle 10 mM (Sigma Chemical, Saint-Louis).

45 Les noyaux intacts sont retirés par centrifugation 2 min à 12 000 g et les protéines du surnageant sont dénaturées avec 4 µl de SDS 20 %, puis digérées avec 2,5 µl de protéinase K à 20 ml/ml, pendant 15 min à 37°C.

Après des extractions au phénol/chloroforme et au chloroforme, l'ARN cytoplasmique est récupéré par précipitation à l'éthanol en présence d'acétate de sodium 3 M.

50 La qualité de l'ARN est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 %, en présence de formaldéhyde.

L'ADNc est préparé à partir de 5 à 10 µg d'ARN total, en présence d'amores oligo-dT et de transcriptase réverse M-MLV (Gibco-BRL, Life Technologies) conformément au protocole selon l'exemple 1.

55 Les amplifications PCR sont réalisées en utilisant la technique *hot start*, en utilisant comme amores, l'amore G.526 (spécifique de l'exon 3) et l'amore G.1225 (spécifique de la région 3' non traduite) et comprennent 35 cycles effectués dans les conditions suivantes :

94°C pendant 1 min, 61°C pendant 1 min 30 et 72°C pendant 2 min. L'absence d'ADN contaminant est vérifiée par une amplification concomitante d'un mélange de PCR sans transcriptase réverse M-MLV (RT-) et

sans matrice (blanc). La spécificité des produits de l'amplification RT est examinée comme décrit ci-dessus à l'exemple 1, à l'aide d'une méthode de Southern, en présence d'une sonde oligonucléotidique G.1200 marquée au  $^{32}P$ .

5 Pour la détection de l'intron 4, on utilise la sonde oligonucléotidique dénommée G.i4A (5'-GAGGCATCAT-GTCTGTTAGG), de SEQ ID NO: 10 ou la sonde G.i4B 5'-AAAGGAGGTGAAGGTGAGGG, de SEQ ID NO: 11.

Après 2 lavages de 15 min, à température ambiante et 2 lavages de 15 min à 50°C, en présence d'un tampon 2X SSC, SDS à 0,1 %, les taches sont exposées à un film à rayons X Fuji avec des écrans intensifiants à -80°C.

10 c) Isolement et séquençage des produits de la RT-PCR :

Les produits de la RT-PCR sont clonés dans un vecteur pCR II en utilisant le kit TA Cloning system (Invitrogen, San Diego, Californie), comme recommandé par le fabricant.

15 La transformation est réalisée avec des cellules compétentes DH $\alpha$ 5F1Q et le criblage des clones recombinants HLA-G est réalisé par hybridation des réplicats avec la sonde G.1200. Les inserts sont excisés par digestion par l'enzyme EcoRI et discriminés conformément à leur poids moléculaire sur un gel d'agarose à 1 %.

20 L'évaluation de la fréquence des transcrits contenant l'intron 4 est déduite à partir du nombre de colonies de réplicats montrant une hybridation positive avec la sonde spécifique de l'intron 4 (G.i4) par rapport au nombre de clones montrant une hybridation positive avec la sonde G.1200.

Pour la détection des exons 4 et 5, on utilise les sondes oligonucléotidiques G.647 (5'-CCACCACCCCTG-TCTTGACT) et G.927 (5'-ATCATGGGTATCGTTGCTGG), respectivement. L'absence d'insertion d'ADN est contrôlée par la sonde oligonucléotidique G.7 (5'-CTAATGTGTCCTCACGGCT), spécifique de l'exon 7.

25 Les clones intéressants sont soumis à une PCR asymétrique, pour générer des matrices simple-brin, puis sont séquencés en utilisant le kit de séquençage T7 Séquenase 2.0 (U.S.B. Touzard-Matignon, France), comme illustré ci-après.

30 d) Résultats :

35 1) **Identification de transcrits épissés alternatifs HLA-G compranant l'intron 4 dans les cellules mono-nucléaires du sang périphérique humain adulte et dans les trophoblastes du premier trimestre :**

Le gel d'électrophorèse des produits de la RT-PCR obtenu avec les amores G.526 et G.1225, obtenus à partir de l'ARN total des cellules mononucléées du sang périphérique adulte mâle, suivi de l'hybridation avec la sonde G.1200, révèle une bande à 0,83 kb, en sus de la bande majeure correspondant à l'ARNm HLA-G1 (0,71 kb) (figure 5).

Ce fragment est encore détecté après l'hybridation des produits de la RT-PCR, à partir de l'ARN cytoplasmique.

40 Pour caractériser la nature de ce fragment important, le produit total de la RT-PCR obtenu à partir des cellules mononucléées de sang périphérique est cloné dans un vecteur pPCRII, comme précisé ci-dessus. Les clones positifs avec la sonde G.1200 sont analysés par digestion par l'enzyme de restriction EcoRI, sélectionnés pour leur longueur et séquencés.

45 La séquence démontre que le fragment de 0,83 kb présente un segment additionnel de 122 paires de bases entre l'exon 4 (figure 6A) et l'exon 5 (figure 6B).

La comparaison avec la séquence HLA-G génomique, indique que ce fragment correspond à l'intron 4.

De plus, le séquençage de la région adjacente 3' révèle l'absence d'exon 7 (figure 6C), comme cela a été déjà observé dans d'autres formes d'ARNm d'HLA-G épissé.

50 Cette nouvelle forme alternative est ci-après dénommée HLA-G5, conformément à la nomenclature sur les transcrits HLA-G (figure 6D).

La recherche du transcrit HLA-G5 dans les trophoblastes du premier trimestre a été réalisée par hybridation en Southern blot, des produits de PCR générés par les amores G.526-G.1225, en utilisant la sonde oligonucléotidique spécifique de l'intron 4 G.i4A.

55 La figure 7 montre la présence d'une bande de 2,2 kb (ADN génomique) et d'une bande d'environ 0,83 kb dans tous les tissus examinés (longueur du fragment HLA-G5).

Pour confirmer ce résultat, les produits de PCR des trophoblastes ont été criblés avec la sonde G.i4A après clonage dans le vecteur pPCRII.

Le séquençage de 2 clones positifs a démontré la même organisation que celle obtenue dans les cellules

mononucléées du sang périphérique.

Le transcrit HLA-G6 a également été mis en évidence, par amplification spécifique avec une sonde G-3 (liaison exon 2-exon 4 : 5'ACCAGAGCGAGGCCAACCCC) (SEQ ID NO: 12) et la sonde G.i4B (SEQ ID NO: 11).

5

## 2) Estimation de la fréquence des transcrits HLA-G contenant l'intron 4 :

Une première hybridation a été effectuée avec la sonde G.i4A et une seconde hybridation a été réalisée avec la sonde G.1200 sur des réplicats obtenus après clonage du produit de la RT-PCR totale obtenu à partir des trophoblastes du premier trimestre et des cellules mononucléées du sang périphérique adulte, générés par les amorces G.526 et G.1225.

10

L'absence d'insertion d'ADN génomique a été contrôlée après hybridation des réplicats avec la sonde spécifique de l'exon 7 (G.7) et la présence d'exon 4 et d'exon 5 est démontrée par hybridation avec les sondes G.647 et G.927.

15

A partir de 437 clones obtenus à partir des cellules mononucléées du sang périphérique et montrant une hybridation positive avec la sonde G.1200, 55 clones se sont révélés être positifs avec la sonde G.i4A ; à partir de 210 clones obtenus à partir des trophoblastes du premier trimestre et montrant une hybridation positive avec la sonde G.1200, 8 clones donnent une hybridation positive avec la sonde G.i4A.

20

Ces résultats montrent que la fréquence de l'ARNm HLA-G interrompu par l'intron 4 est supérieure dans les cellules mononucléées du sang périphérique dans les trophoblastes : le rapport G.i4/G. 1200 est de 1/8 pour les cellules mononucléées du sang périphérique et de 1/26 pour les trophoblastes.

Il ressort de ces résultats que l'ARNm HLA-G interrompu par l'intron 4 entre les exons 4 et 5 est présent *in vivo* à la fois dans les cellules mononucléées du sang périphérique adulte et dans les trophoblastes humains du premier trimestre avec une abondance supérieure dans le matériel hématopoïétique.

25

Pour ce qui concerne la protéine HLA-G obtenue avec un tel transcrit, il est important de noter que la séquence d'intron 4 introduit un codon stop au niveau du nucléotide 63 en aval de l'extrémité 3' de l'exon 4.

Un codon stop en amont de l'exon 5 a également été observé. De manière inattendue, un tel transcrit, ne comprenant plus d'exon 5 (région codant pour la protéine transmembranaire) permet d'obtenir des protéines solubles qui sont particulièrement utiles en tant que produit immunotolérant.

30

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écartez du cadre, ni de la portée de la présente invention.

35

40

45

50

55

## LISTE DE SEQUENCES

## 5 (1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:  
 (A) NOM: COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE (CEA)  
 (B) RUE: 31-33 RUE DE LA FEDERATION  
 (C) VILLE: PARIS  
 (E) PAYS: FRANCE  
 (F) CODE POSTAL: 75015

10 (ii) TITRE DE L' INVENTION: TRANSCRITS DU GENE DE CMH DE CLASSE I HLA-G ET LEURS APPLICATIONS.

15 (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 12

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:  
 (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk  
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

20 (vi) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:  
 (A) NUMERO DE LA DEMANDE: FR 9403179  
 (B) DATE DE DEPOT: 18-MAR-1994

## 25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 443 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

30 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

## 35 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

CCAATGTGGC TGAACAAAGG AGAGCCTACC TGGAGGGCAC GTGCGTGGAG TGGCTCCACA	60
GATACTGGA GAACGGGAAG GAGATGCTGC AGCGCGCGGA GCAGTCCTCC CTGCCACCA	120
TCCCCATCAT GGGTATCGTT GCTGGCCTGG TTGTCCTTG AGCTGTAGTC ACTGGAGCTG	180
40 CGGTCGCTGC TGTGCTGTGG AGRAAGAAGA GCTCAGATTG AAAAGGAGGG AGCTACTCTC	240
AGGCTGCAAT GTGAAACAGC TGCCCTGTGT GGGACTGAGT GGCAAGTCCC TTTGTGACTT	300
CAAGAACCT GACTTCTCTT TSTGCAGAGA CCAGCCCACC CCTGTGCCCA CCATGACCCT	360
45 CTTYCTCATG CTGAACTGCA TTCCTTCCCC AATCACCTTT CCTGTTCCAG AAAAGGGGCT	420
GGGATGTCTC CGTCTCTGTC TCA	443

## 50 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 21 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

55 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

5 GGAAGAGGAG ACACCGGAAC A

21

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

10

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

CCAATGTGGC TGAACAAAGG

20

20 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

25

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

30

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

CCCCTTTTCT GGAACAGGAA

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

35

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

40

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

45

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

TGAGACAGAG ACGGAGACAT

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

50

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

55

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CAGCGCGCGG AGCAGTCTTC

20

## 5 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 72 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## 10 (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

15

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

Asn	Val	Ala	Glu	Gln	Arg	Arg	Ala	Tyr	Leu	Glu	Gly	Thr	Cys	Val	Glu
1				5					10				15		

Trp	Leu	His	Arg	Tyr	Leu	Glu	Asn	Gly	Lys	Glu	Met	Leu	Gln	Arg	Ala
				20				25			30				

Glu	Gln	Ser	Ser	Leu	Pro	Thr	Ile	Pro	Ile	Met	Gly	Ile	Val	Ala	Gly
				35		40			45						

Leu	Val	Val	Leu	Ala	Ala	Val	Val	Thr	Glu	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Val
				50		55		60							

Leu	Trp	Arg	Lys	Lys	Ser	Ser	Asp								
	65				70										

## 30 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 145 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## 35 (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## 40 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

Asn	Val	Ala	Glu	Gln	Arg	Arg	Ala	Tyr	Leu	Glu	Gly	Thr	Cys	Val	Glu
1				5					10			15			

Trp	Leu	His	Arg	Tyr	Leu	Glu	Asn	Gly	Lys	Glu	Met	Leu	Gln	Arg	Ala
				20			25		30						

Asp	Pro	Pro	Lys	Thr	His	Val	Thr	His	His	Pro	Val	Phe	Asp	Tyr	Glu
				35		40			45						

Ala	Thr	Leu	Arg	Cys	Trp	Ala	Leu	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ala	Glu	Ile	Ile
				50		55		60							

Leu	Thr	Trp	Gln	Arg	Asp	Gly	Glu	Asp	Gln	Thr	Gln	Asp	Val	Glu	Leu
				65		70		75		80					

Val	Glu	Thr	Arg	Pro	Ala	Gly	Asp	Gly	Thr	Phe	Gln	Lys	Trp	Ala	Ala
				85			90		95						

Val	Val	Val	Pro	Ser	Gly	Glu	Glu	Gln	Arg	Tyr	Thr	Cys	His	Val	Gln

100                    105                    110

5 His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu Arg Trp Ser Lys Glu Gly  
       115                    120                    125

Asp Gly Gly Ile Met Ser Val Arg Glu Ser Arg Ser Leu Ser Glu Asp  
       130                    135                    140

10 Leu  
       145

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

15 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
       (A) LONGUEUR: 117 acides aminés  
       (B) TYPE: acide aminé  
       (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
       (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

20

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

25 Gln Ser Glu Ala Asn Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro Val  
       1                    5                    10                    15

Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro  
       20                    25                    30

Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln  
       35                    40                    45

30 Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln  
       50                    55                    60

Lys Trp Ala Ala Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr Thr  
       65                    70                    75                    80

35 Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu Arg Trp  
       85                    90                    95

Ser Lys Glu Gly Asp Gly Gly Ile Met Ser Val Arg Glu Ser Arg Ser  
       100                    105                    110

40 Leu Ser Glu Asp Leu  
       115

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

45 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
       (A) LONGUEUR: 20 paires de bases  
       (B) TYPE: nucléotide  
       (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
       (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

55 GAGGCATCAT GTCTGTTAGG

20

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:



6°) Oligonucléotide, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et en ce qu'il présente la SEQ ID NO: 3.

7°) Oligonucléotide, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et en ce qu'il présente la SEQ ID NO: 4.

5 8°) Oligonucléotide, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et en ce qu'il présente la SEQ ID NO: 5.

9°) Oligonucléotide, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et en ce qu'il présente la SEQ ID NO: 6.

10 10°) Sondes nucléotidiques, caractérisées en ce qu'elles sont constituées par une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 ou un fragment de celle-ci, marquée à l'aide d'un marqueur tel qu'un isotope radioactif, une enzyme appropriée ou un fluorochrome.

11°) Sonde selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle présente la SEQ ID NO: 6 selon la revendication 9.

15 12°) Sonde selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle présente la SEQ ID NO: 4 selon la revendication 7.

13°) Paires d'amorces pour la synthèse d'une séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisées en ce que chaque amorce comprend une séquence ou un fragment de séquence selon l'une quelconque des revendications 5 à 9.

20 14°) Paire d'amorces selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle est constituée par un oligonucléotide de SEQ ID NO: 2 selon la revendication 5, apparié à un oligonucléotide de SEQ ID NO: 5 selon la revendication 8.

15°) Paire d'amorces selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle est constituée par un oligonucléotide de SEQ ID NO: 3 selon la revendication 6, apparié à un oligonucléotide de SEQ ID NO: 5 selon la revendication 8.

25 16°) Utilisation d'une séquence d'ADNc, dénommée HLA-G-5 et issue d'un ARNm du gène HLA-G humain du CMH de cellules mononucléées circulantes d'adultes, comprenant successivement de 5' en 3' :

- un fragment codant pour le peptide signal (exon 1),
- un fragment codant pour le domaine  $\alpha 1$  (exon 2),
- un fragment codant pour le domaine  $\alpha 2$  (exon 3),
- un fragment codant pour le domaine  $\alpha 3$  (exon 4),
- l'intron 4,
- un fragment codant pour le domaine transmembranaire TM (exon 5),
- un fragment codant pour le domaine cytoplasmique (exon 6) et
- le fragment 3' non traduit (exon 8),

30 35 pour la préparation d'un médicament destiné à une utilisation comme agent immunomodulateur.

17°) Utilisation d'une séquence d'ADNc, dénommée HLA-G-6 et issue d'un ARNm du gène HLA-G humain du CMH de cellules mononucléées circulantes d'adultes, comprenant successivement de 5' en 3' :

- un fragment codant pour le peptide signal (exon 1),
- un fragment codant pour le domaine  $\alpha 1$  (exon 2),
- un fragment codant pour le domaine  $\alpha 3$  (exon 4),
- l'intron 4,
- un fragment codant pour le domaine transmembranaire TM (exon 5),
- un fragment codant pour le domaine cytoplasmique (exon 6) et
- le fragment 3' non traduit (exon 8),

40 45 pour la préparation d'un médicament destiné à une utilisation comme agent immunomodulateur.

18°) Utilisation d'une séquence selon la revendication 16 ou la revendication 17, sans exon 6 et/ou sans exon 8.

50 19°) Procédé d'obtention de protéines solubles immunotolérantes, caractérisé, en ce qu'il comprend la construction d'un vecteur d'expression dans lequel est insérée une séquence avec intron 4, issue de cellules mononucléées circulantes d'adultes, telle que définie à l'une quelconque des revendications 16 à 18 et l'expression desdites protéines solubles.

20°) Peptides ou fragments peptidiques, caractérisés en ce qu'ils sont codés par au moins un fragment selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 16 à 18.

21°) Peptide selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il répond à la SEQ ID NO: 7.

55 22°) Peptide selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il est codé par un fragment du transcript HLA-G5 et répond à la SEQ ID NO: 8.

23°) Peptide selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il est codé par un fragment du transcript HLA-G6 et répond à la SEQ ID NO: 9.

**24°) Procédé de sélection et d'enrichissement en cellules hématopoïétiques indifférenciées (cellules sanguines immatures ou cellules souches), caractérisé en ce qu'il comprend :**

- (a) le prélèvement d'un échantillon sélectionné, selon le cas, parmi le sang périphérique, le sang de cordon ombilical ou la moelle osseuse,
- 5 (b) la mise en contact dudit échantillon avec des anticorps anti-CD34,
- (c) la séparation des complexes cellules contenant un antigène CD34-anticorps anti-CD34 formés,
- (d) la réalisation d'une RT-PCR *in situ* sur les cellules obtenues à l'étape (c) en présence d'amorces marquées à l'aide d'un fluorochrome selon l'une quelconque des revendications 13 à 15,
- (e) la séparation des cellules fluorescentes, obtenues et
- 10 (f) la sélection des cellules non fluorescentes immatures pluripotentes.

**25°) Procédé de détection de cellules exprimant le transcrit selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend, *in situ*, la mise en oeuvre d'une RT-PCR, par :**

- (a) mise en contact de cellules sanguines avec une paire d'amorces marquées selon l'une quelconque des revendications 13 à 15 et
- 15 (b) séparation des cellules marquées par tout moyen convenable.

**26°) Procédé de détection de cellules sanguines et plus particulièrement de cellules mononucléées circulantes d'adultes, exprimant un transcrit comprenant l'intron 4, caractérisé en ce qu'il comprend, *in situ*, la mise en oeuvre d'une RT-PCR, par :**

- (a) mise en contact de cellules sanguines avec une paire d'amorces marquées, conforme à l'invention, sélectionnée parmi les paires (1)-(2) et (3)-(4) selon l'une quelconque des revendications 13 à 15,
- 20 (b) sélection des transcrits comprenant l'intron 4, par hybridation avec une sonde, éventuellement marquée, sélectionnée parmi la sonde de SEQ ID NO: 10 et la sonde de SEQ ID NO: 11 et
- (b) séparation des cellules marquées par tout moyen convenable, notamment par cytofluorométrie.

**27°) Anticorps, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre les protéines HLA-G selon l'une quelconque des revendications 20 à 23.**

**28°) Procédé de séparation de cellules foetales nucléées, à partir d'un échantillon de sang maternel, caractérisé en ce qu'il comprend :**

- (1) la mise en contact de l'échantillon de sang maternel avec des anticorps dirigés contre les protéines HLA-G selon la revendication 27, et
- 30 (2) la séparation des complexes cellules foetales-anticorps obtenus.

**29°) Procédé de séparation spécifique de cellules mononucléées circulantes, caractérisé en ce qu'il comprend, *in situ*, la mise en oeuvre d'une RT-PCR, par :**

- (a) mise en contact de cellules sanguines avec une paire d'amorces marquées selon l'une quelconque des revendications 13 à 15 et
- 35 (b) séparation convenable des cellules marquées.

**30°) Médicament, caractérisé en ce qu'il comprend un peptide selon la revendication 20 ou la revendication 21.**

**31°) Compositions immunotolérantes, caractérisées en ce qu'elles comprennent un peptide selon la revendication 20 ou la revendication 21, associé à un véhicule ou un support convenable du point de vue pharmaceutique.**

**32°) Utilisation des peptides selon la revendication 22 ou la revendication 23, pour la préparation d'un médicament à activité immunomodulatrice.**

**33°) Procédé de détection de récepteurs CD8, caractérisé en ce que l'on met en contact des cellules mononucléées avec un peptide selon l'une quelconque des revendications 20 à 23 et en ce que l'on détecte les complexes CD8 peptides par tout moyen approprié.**

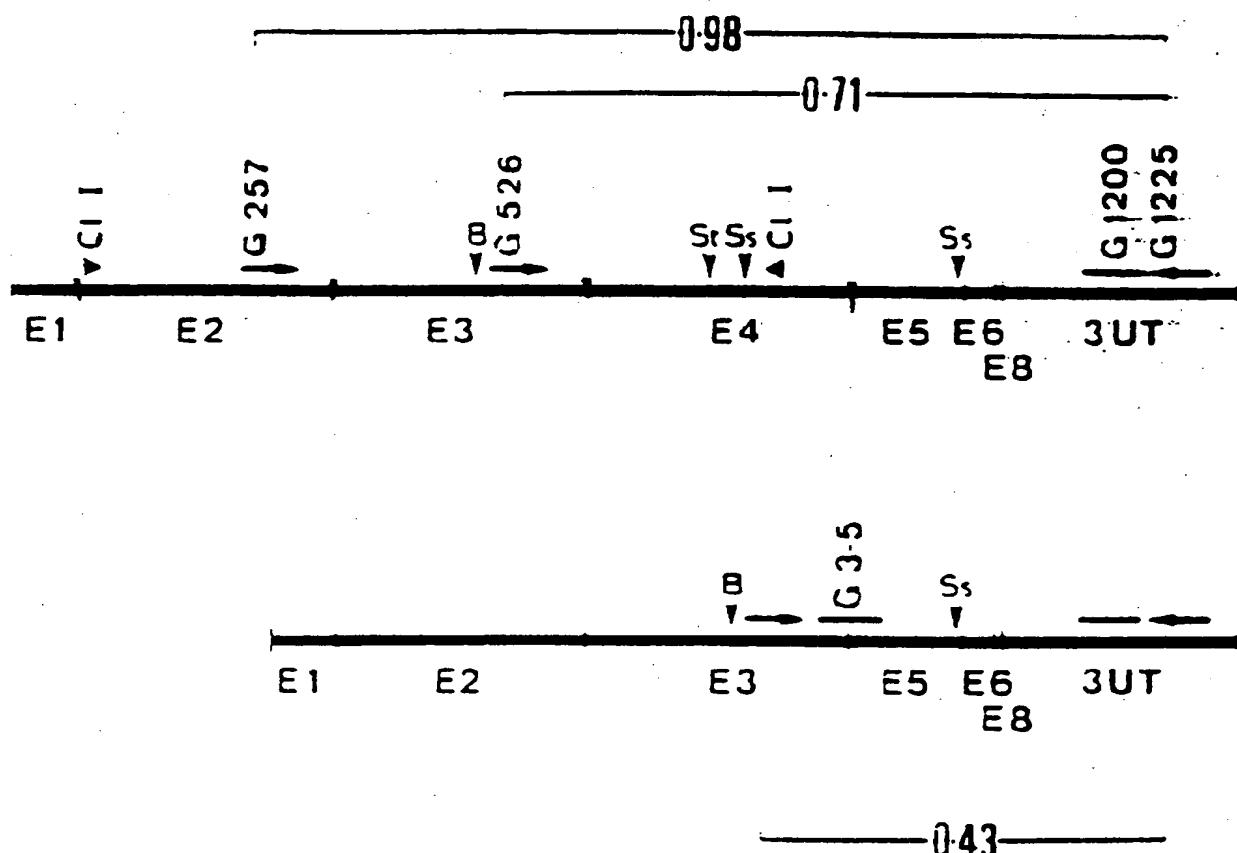


FIGURE 1

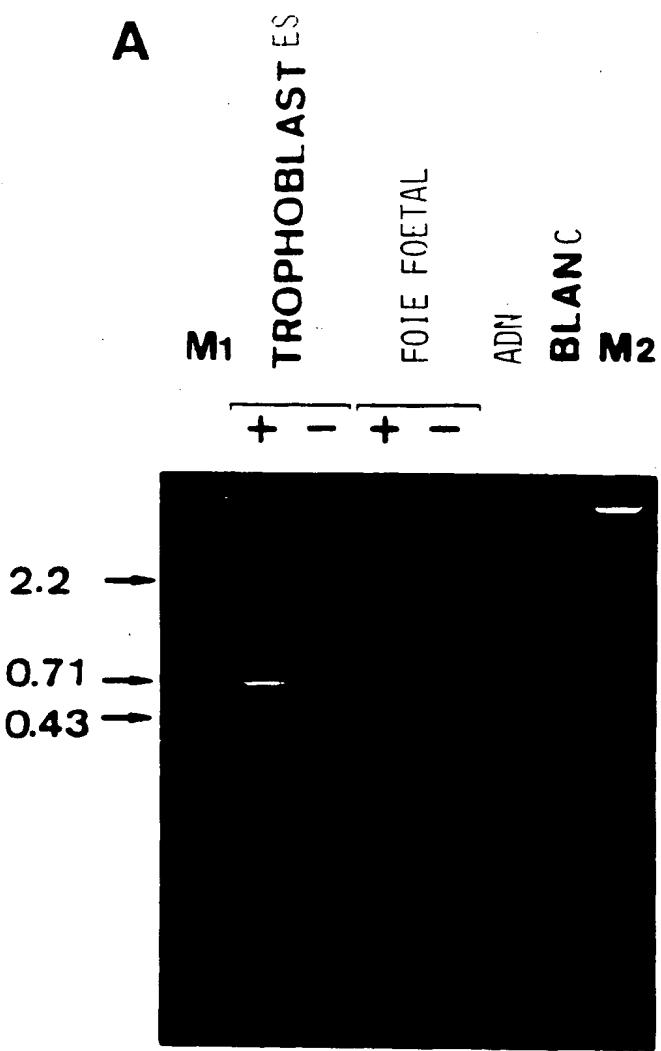


FIGURE 2A

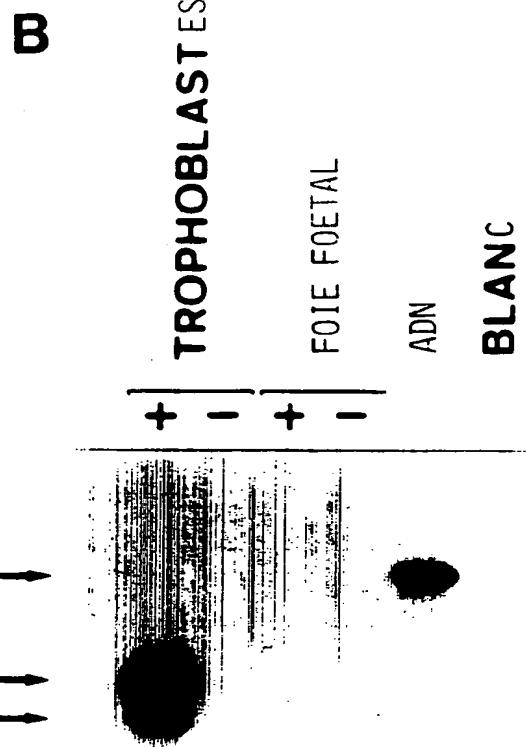


FIGURE 2B

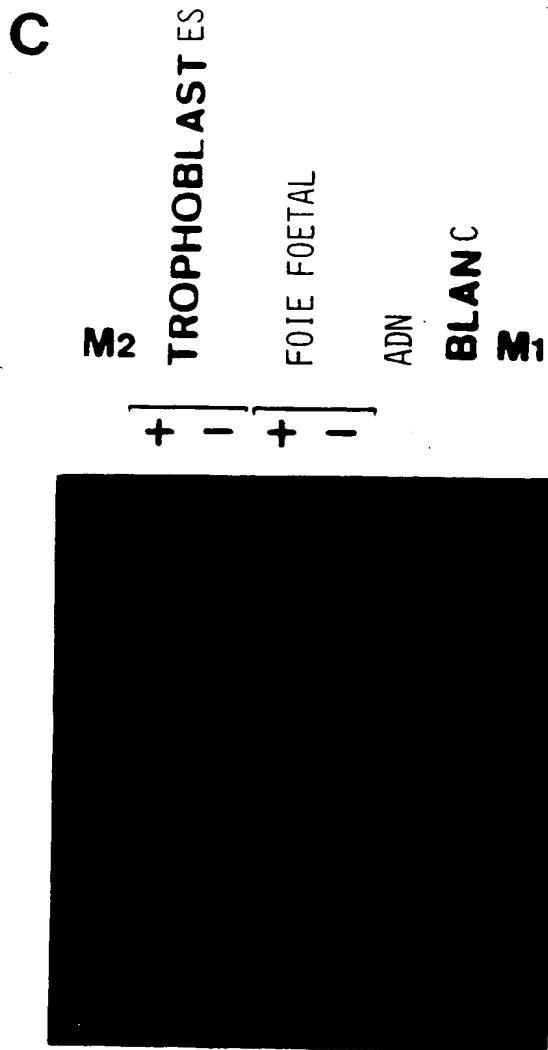


FIGURE 2C



FIGURE 3A

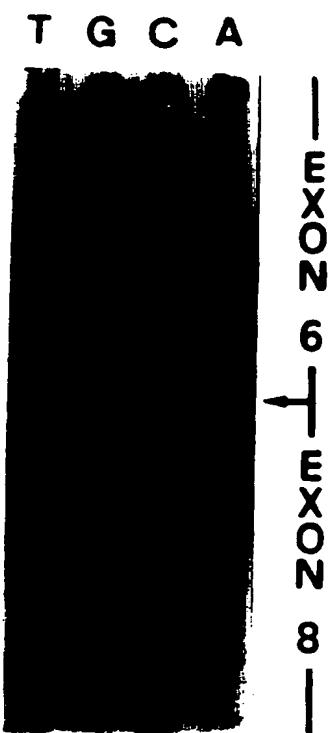


FIGURE 3B

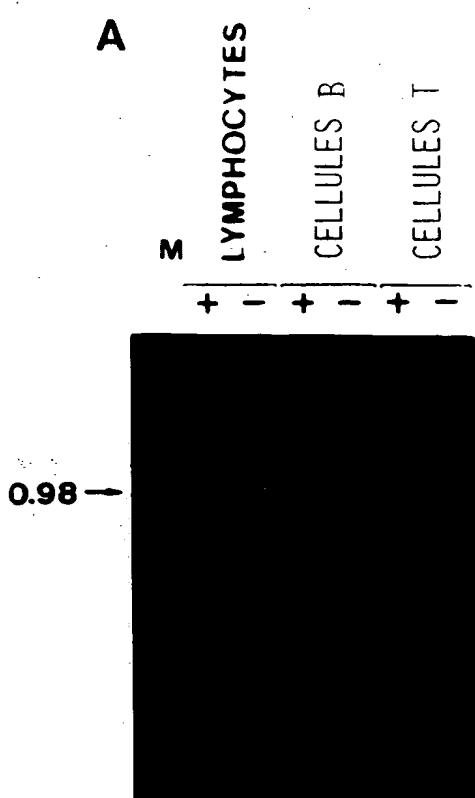


FIGURE 4A

B

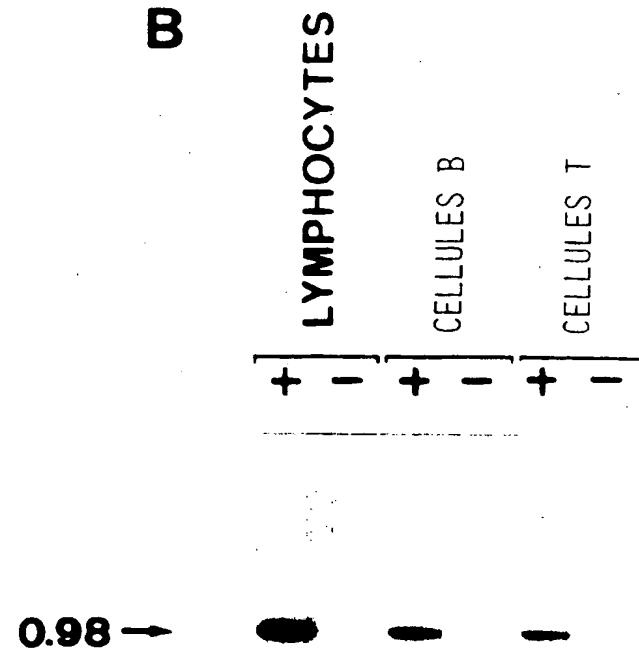


FIGURE 4B

0.83  
0.71 →



+  
-  
+  
-

P B M C

BLANK  
DNA



↑ 2.2

FIGURE 5

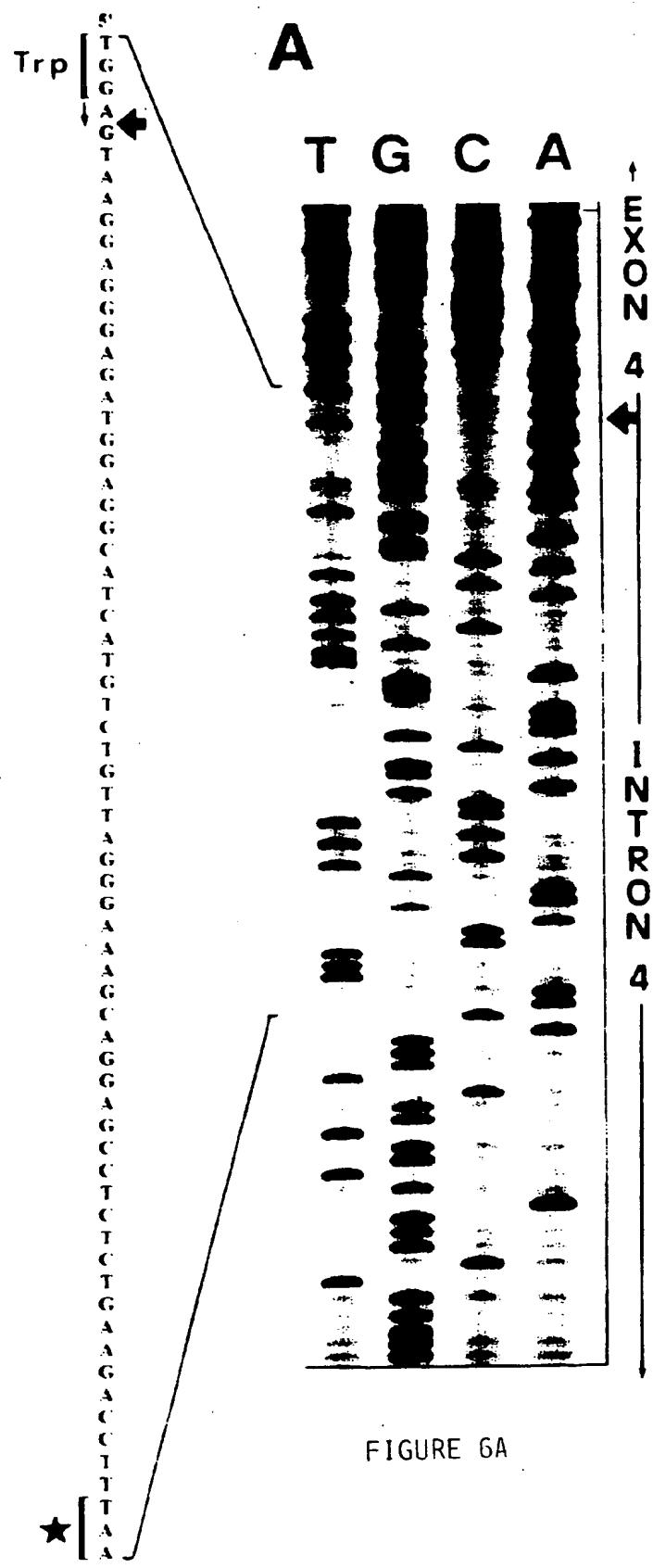


FIGURE 6A

B

T G C A

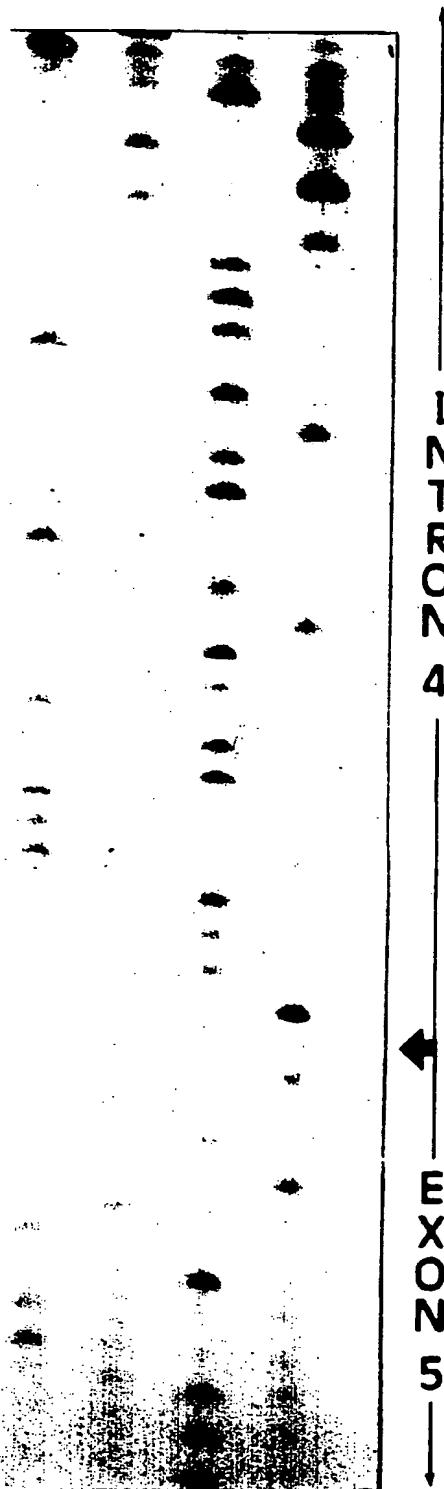


FIGURE 6B

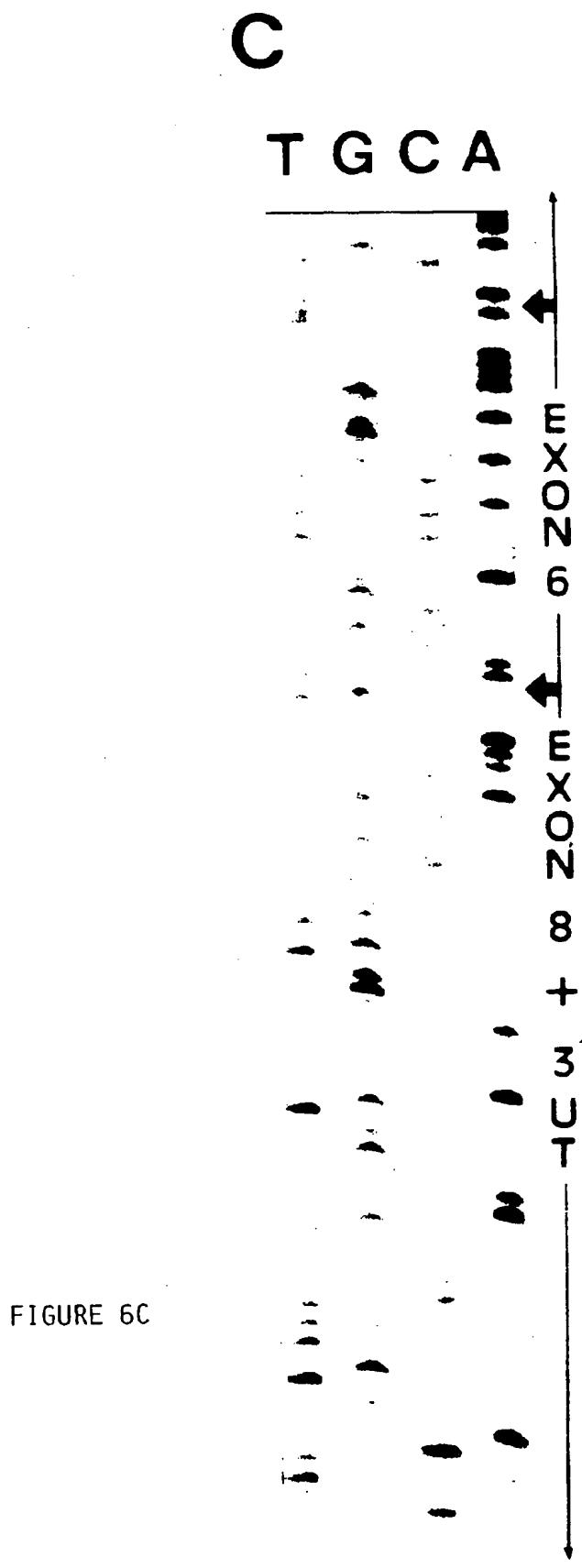


FIGURE 6C

D

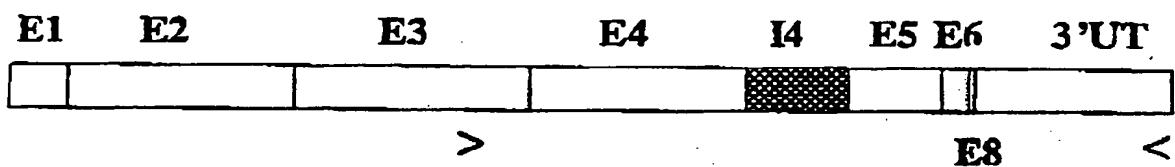


FIGURE 6D

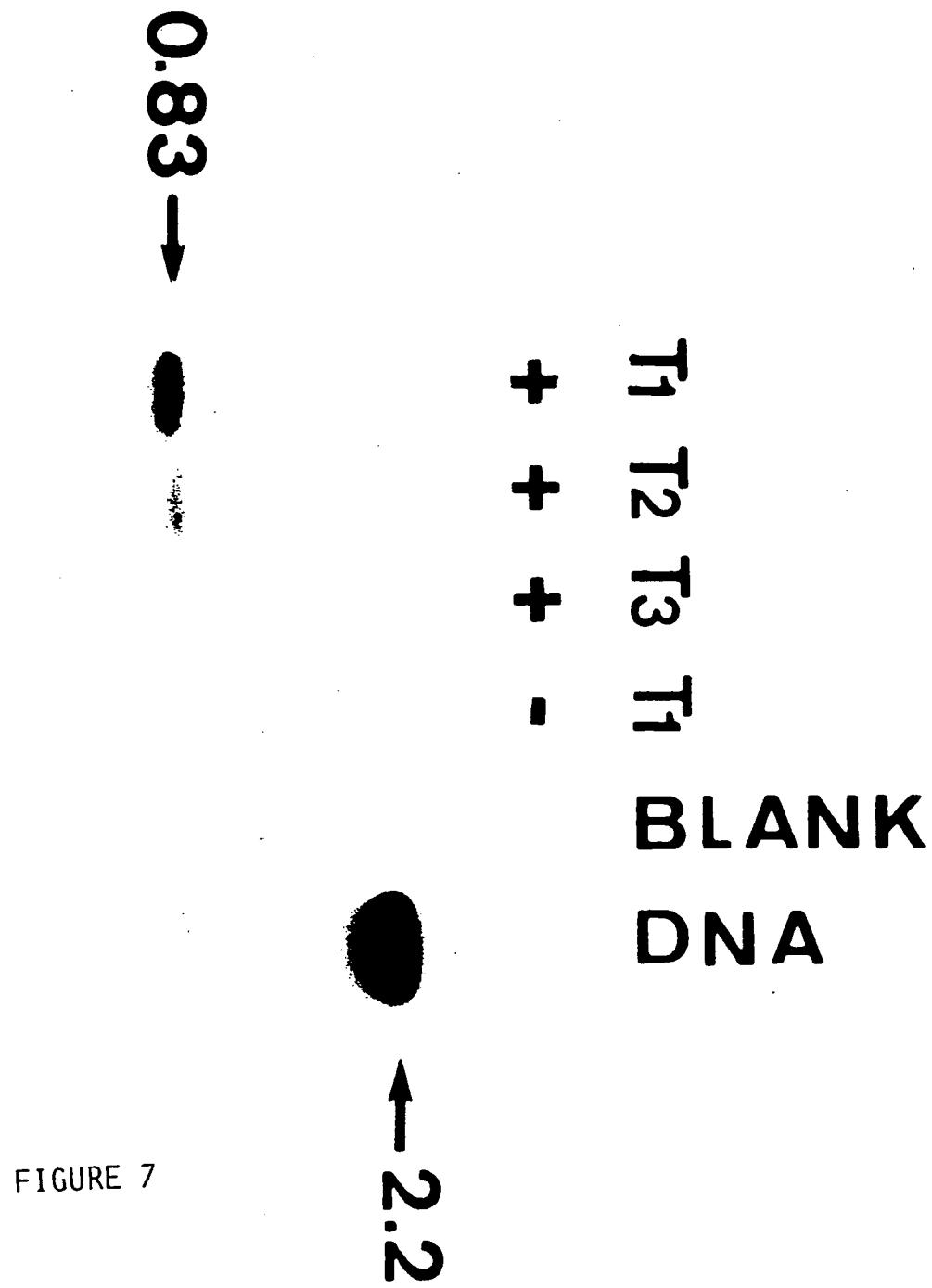


FIGURE 7



Office européen  
des brevets

**RAPPORT PARTIEL  
DE RECHERCHE EUROPEENNE**  
qui selon la règle 45 de la Convention sur le brevet  
européen est considéré, aux fins de la procédure ultérieure  
comme le rapport de la recherche européenne

Numéro de la demande  
**EP 95 40 0592**

<b>DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>			<b>CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.)</b>
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	
D,A	<p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 18, no. 8, 25 Avril 1990 OXFORD, GRANDE BRETAGNE, page 2189</p> <p>H. SHUKLA ET AL. 'The mRNA of a human class I gene HLA G/HLA 6.0 exhibits a restricted pattern of expression.' * le document en entier *</p> <p>---</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol. 89, no. 9, 1 Mai 1992 WASHINGTON DC, ÉTATS UNIS, pages 3947-3951.</p> <p>A. ISHITANI ET AL. 'Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens.'</p> <p>* abrégé *</p> <p>* figure 5 *</p> <p>---</p> <p>---</p>	1-15	C12N15/12 C12Q1/68 C07K14/74 G01N33/569 C07K16/28 A61K38/17
D,A		1-15, 19-23, 27,28	
		-/-	
			<b>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.)</b>
			C12N C12Q C07K G01N A61K
<b>RECHERCHE INCOMPLETE</b>			
<p>La division de la recherche estime que la présente demande de brevet européen n'est pas conforme aux dispositions de la Convention sur le brevet européen au point qu'une recherche significative sur l'état de la technique ne peut être effectuée au regard d'une partie des revendications.</p> <p>Revendications ayant fait l'objet de recherches complètes:</p> <p>Revendications ayant fait l'objet de recherches incomplètes:</p> <p>Revendications n'ayant pas fait l'objet de recherches:</p> <p>Raison pour la limitation de la recherche</p>			
<p>voir feuille supplémentaire C</p>			
Lieu de la recherche <b>LA HAYE</b>	Date d'achèvement de la recherche <b>5 Juillet 1995</b>	Examinateur <b>Nooij, F</b>	
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b>			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

**RECHERCHE INCOMPLETE**

**REMARQUE :** Bien que la revendication 33 (en partie, pour le cas où une *in vivo* méthode est revendiquée) concerne une méthode de diagnostic, appliquée au corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets inputés au produits / à la composition.



Office européen  
des brevets

**RAPPORT PARTIEL  
DE RECHERCHE EUROPEENNE**

Numéro de la demande  
EP 95 40 0592

<b>DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>			<b>CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.CI6)</b>
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	
D,A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol. 84, no. 24, 15 Décembre 1987 WASHINGTON DC, ÉTATS UNIS, pages 9145-9149, D. GERAGHTY ET AL. 'A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment.' * abrégé * * figures 1,2 *	1-15	
A	CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, vol. 5, no. 1, 1993 PHILADELPHIA PA, ÉTATS UNIS, pages 3-7, D. GERAGHTY 'Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes.' * page 5, colonne de gauche, ligne 6 - ligne 23 *	1-15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CI6)
A	THE FASEB JOURNAL, vol. 4, no. 7, 26 Avril 1990 BETHESDA MD, ÉTATS UNIS, page A2216 D. GERAGHTY ET AL. 'Production of monoclonal antibodies specific for the new class I antigen HLA-G and their use to examine expression in trophoblast cells.' * résumé 3016 *	27,28 -/-	



Office européen  
des brevets

**RAPPORT PARTIEL  
DE RECHERCHE EUROPEENNE**

Numéro de la demande  
EP 95 40 0592

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.)
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.)
A	THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 174, no. 3, 1 Septembre 1991 NEW YORK, NY, ÉTATS UNIS, pages 737-740, S. SANDERS ET AL. 'Cell-cell adhesion mediated by CD8 and human histocompatibility leukocyte antigen G, a nonclassical major histocompatibility complex class I molecule on cytотrophoblasts.' * le document en entier * ---	33	
P,X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol. 91, no. 10, 10 Mai 1994 WASHINGTON DC, ÉTATS UNIS, pages 4209-4213, M. KIRSZENBAUM ET AL. 'An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcripts in adult lymphocytes.' * le document en entier * ---	1-15,25	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.)
P,X	FOLIA BIOLOGICA, vol. 40, no. 6, 1994 RÉPUBLIQUE TCHEQUE, pages 431-438, P. MOREAU ET AL. 'HLA-G mRNA forms in human trophoblasts and peripheral blood lymphocytes: Potential use in prenatal diagnosis.' * le document en entier * ----	1-15,25	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**